

# Recherches immunologiques sur la péripneumonie.

## XI. UN VACCIN VIVANT MIXTE ANTIBOVIPESTIQUE - ANTIPERIPNEUMONIQUE INOCULE EN UN SEUL TEMPS. CONCEPTION - PRODUCTION - CONTROLES

par A. PROVOST, C. BORREDON et R. QUEVAL (\*)

### RESUME

Après avoir indiqué les premières difficultés rencontrées dans l'association des vaccins contre la peste bovine et la péripneumonie, les auteurs exposent les problèmes qu'ils ont eu à résoudre pour la production d'un vaccin mixte : choix des souches vaccinales (RPOK-BK pour la peste, KH 3 J pour la péripneumonie), sélection d'un mutant streptomycino-résistant de la souche KH 3 J, enrichissement des cultures du mycoplasme, lyophilisation du produit final.

La technique de production du vaccin mixte, auquel a été donné le nom de code : Bisec, est décrite en détail ainsi que les contrôles de production. L'application à très grande échelle de la vaccination mixte au Tchad (5.500.000 vaccinations en 3 ans) a permis d'abaisser de façon spectaculaire le nombre des foyers de péripneumonie de plus de 200 à une dizaine. Pourtant les contrôles du laboratoire, effectués par cohabitation de vaccinés avec des malades, indiquent que la protection conférée par la souche KH 3 J ne dépasse valablement guère plus de 6 mois. Le succès indéniable de la vaccination doit tenir à sa généralisation au troupeau tchadien et à sa répétition annuelle.

### I. IDEE DE LA VACCINATION ASSOCIEE ANTIBOVIPESTIQUE- ANTIPERIPNEUMONIQUE

Il n'y a pas lieu ici de passer en revue les progrès accomplis dans l'immunisation de ces deux fléaux que sont, pour les bovins d'Afrique intertropicale, la peste bovine et la péripneumonie : il y a loin de la pulpe tissulaire formolée de CURASSON et DELPY — pourtant

immense progrès d'alors — aux vaccins de cultures cellulaires actuels et du procédé willemiens de vaccination aux vaccins lyophilisés contre la péripneumonie.

Il est pourtant curieux de constater que l'idée de la vaccination simultanée contre les deux maladies, et non pas encore l'association vaccinale, semble avoir préoccupé les utilisateurs et services intéressés depuis une dizaine d'années seulement. L'utilité d'un tel produit, ou même plus simplement d'un tel procédé, est pourtant évidente. En 1958, PRIESTLEY (27), au Soudan, concluait que la vaccination simultanée avec le vaccin antipestique caprinisé et le vaccin antipéripneumonique adjuvé par la gélose n'était pas à recommander parce que la réaction thermique post-vaccinale due au vaccin caprinisé entravait l'immunogénèse péri-

(\*) Institut d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux; Laboratoire de Recherches Vétérinaires de Farcha, Fort-Lamy, Tchad.

Aide technique de Madame G. DUFAU et de Monsieur Z. N'GALDAM.

Ce travail a fait l'objet d'une communication à la XXXVII<sup>e</sup> session générale du comité de l'O.I.E. Paris, 19-24 mai 1969. Rapport n° 112.

pneumonique. A la même époque, au Tchad, PROVOST (28), tout en reconnaissant l'apparente innocuité de l'association du vaccin caprinisé et du vaccin antipéripleurmonique d'ovoculture, hésitait lui aussi à en recommander l'emploi par suite de l'incertitude des conditions expérimentales alors existantes au sujet de la sensibilité des bovins d'expérience à la peste bovine.

Les expériences de BROWN au Kenya (2) réalisées quelques années plus tard, confirmaient le bien fondé de cette prudente expectative, en montrant que la réaction vaccinale au vaccin caprinisé rendait plus sensibles les bovins à l'intubation endobronchique de souches péripleurmoniques même semi-pathogènes dans les conditions ordinaires. La question de l'innocuité de l'association restait toujours posée.

Il en était tout autant de son efficacité. On sait en effet (39) que la réaction post-vaccinale au vaccin caprinisé est physiologiquement caractérisée par une brutale leucopénie touchant spécialement les lymphocytes et dont sont témoins les images histologiques de ganglions lymphatiques de bovins vaccinés, où est évidente la dépopulation lymphocytaire et plasmocytaire. On pouvait donc craindre, sur des bases théoriques, que l'immunogénèse péripleurmonique fut troublée, ces cellules étant génératrices d'anticorps. C'était d'ailleurs bien à quoi concluaient les expériences de PRIESTLEY (27) et celles qu'avait entreprises Miss SIMPSON (37) d'où il ressortait clairement qu'était entravée l'immunité post-vaccinale des antigènes bactériens inoculés en même temps que le vaccin capripéste à des bovins sensibles à la peste. Aussi est-ce dans le sens négatif qu'à la question posée par les praticiens de l'opportunité de l'association vaccinale devait répondre le groupe d'experts FAO/OIE/OUA sur la péripleurmonie lors de la seconde réunion (35). Une expérience faite par LINDLEY au Soudan (16) confirmait cette opinion tandis qu'un essai réalisé au Tchad tournait à la catastrophe (30), avec l'importantes réactions willemsiennes suite à l'inoculation simultanée en deux points différents d'un vaccin d'ovoculture et du vaccin caprinisé. Il était dans ce dernier cas difficile d'apprécier la responsabilité tenant à l'association plutôt qu'à une faute technique d'inoculation, mais ces accidents eurent au moins le mérite pragmatique

de hâter la mise au point du vaccin mixte, objet de ces lignes.

Il est bien évident que les réserves faites ci-dessus concernent essentiellement la primo-vaccination antipestique pour autant qu'elle soit réalisée chez les animaux sensibles.

Lors des revaccinations, il ne doit plus avoir lieu de craindre d'effet nocif de l'antigène capripéste. Toutefois la prudence ne permettait pas toujours que l'on mît deux produits dans les mains des vaccinateurs, l'un monovalent destiné aux jeunes primovaccinés, l'autre mixte destiné aux revaccinations.

L'idée de l'association des deux types de vaccins était pourtant dans l'air depuis 1962, alors que débutait la campagne de vaccination antipestique interafricaine (13). Une expérience préliminaire de MACADAM, EZEBUIRO et OREFO (17) montrait que l'inoculation en deux points différents du vaccin antipestique de cultures cellulaires, souche RPOK-BK de PLOWRIGHT et FERRIS (22), et du vaccin antipéripleurmonique, souche KH 3 J, était suivie d'une bonne immunogénèse pour l'un et l'autre des composants; toutefois, l'inoculation associée dans une même seringue n'était pas préconisée, le sérum de bœuf présent dans les cultures du microbe péripleurmonique pouvant neutraliser le virus pestique et d'autre part, la streptomycine des liquides de cultures cellulaires pouvant éventuellement se montrer mycoplasmodicide à la concentration utilisée.

Le Laboratoire de Farcha se penchait de son côté sur le problème de l'association vaccinale, association qui du point de vue pratique s'avérerait capitale. En effet, le Service de l'Elevage du Tchad, pour des raisons qu'expose ailleurs P. LACHAUX (11), ne pouvait envisager la prophylaxie de la péripleurmonie que par la seule vaccination. Encore fallait-il que cette vaccination fût couplée à une vaccination antipestique pour que, sous le couvert de cette dernière, soit acceptée la vaccination antipéripleurmonique faite ainsi subrepticement à l'insu de propriétaires assez peu coopératifs. Par ailleurs, on l'a déjà dit, la mixtion apportait un élément de sécurité au niveau des vaccinateurs: c'était donc un vaccin mixte qui s'imposait et non l'association extemporanée des deux immunogènes ainsi que, a fortiori, l'inoculation faite en deux points. Il fallait bien sûr qu'il fût lyophilisé pour répondre aux rudes conditions du sahel tchadien.

## II. DIFFICULTES A RESOUDRE POUR LA PRODUCTION D'UN VACCIN MIXTE ANTIBOVIPESTIQUE- ANTIPERIPNEUMONIQUE

### 1. *Choix et conditions d'utilisation de la souche vaccinale bovipestique*

Depuis 1960, le Laboratoire de Farcha manipule la souche RPOK-BK de PLOW-RIGHT et FERRIS (29) et de 1962 à 1965 plus de deux millions de doses de vaccin ont été produites.

Le 35<sup>e</sup> passage en cultures cellulaires de la souche a été retenu non parce qu'on supposait que son caractère immunogène était plus accentué qu'à un passage supérieur, mais parce qu'à ce 35<sup>e</sup> passage le vaccin se montrait encore très légèrement hyperthermisant chez quelques veaux. Or, de la part d'une population pastorale habituée aux violentes réactions post-vaccinales du vaccin caprinisé, on pouvait craindre des réticences lors de l'utilisation d'un vaccin parfaitement inoffensif, ceci pendant une période d'adaptation; d'où le choix de ce passage.

Ce raisonnement a priori a d'ailleurs été mis en défaut dans la pratique car rares ont été les réactions thermiques enregistrées, sauf sur des taurins baoulés.

La stabilité des caractères génétiques fut attestée par cinq passages de retour en série chez le zébu sensible, sans qu'au 5<sup>e</sup> passage se manifestassent des signes morbides, dont l'hyperthermie, supérieurs à ceux du premier.

Concernant les vaccins antipestiques de cultures cellulaires, un certain nombre d'auteurs (10, 25) ont montré qu'une dose vaccinale pour le bœuf était contenue dans une dose cytopathogène 50 p. 100 (DCP 50) pour les cellules rénales bovines. Mais, par ailleurs, il a été observé que plus élevé était le titre du vaccin inoculé au bœuf, meilleure était la réponse immunitaire estimée par le titre en anticorps sériques (1), ce qui a son importance dans la durée de l'immunité post-vaccinale (26).

Ceci étant, et si l'on tient compte de toutes les causes, prévisibles et imprévisibles, de dégradation du vaccin qui peuvent se produire depuis sa production jusqu'au moment où le virus est inoculé sous la peau (stockage, pannes de conservateur, chocs thermiques, dilution avec des liquides de reconstitution non réfri-

gérés, longues séances de vaccination, action de la lumière solaire...), il tombe sous le sens que le laboratoire producteur se doit de fournir un vaccin du plus haut titre possible pour que les bovins vaccinés reçoivent le minimum requis et, autant que faire se peut, beaucoup plus de 100 DCP 50, seuil inférieur garant d'une immunisation de qualité (11, 22). C'est pour cette raison que nous nous sommes attachés à produire un vaccin de la plus grande qualité possible en améliorant des points de détail des techniques habituelles; nos procédés seront décrits plus loin.

### 2. *Choix de la souche vaccinale péripleurmonique*

En 1964, lors de la seconde réunion du groupe d'experts sur la péripleurmonie (1), des opinions très satisfaisantes avaient été émises au sujet de la souche KH 3 J. Isolée en 1940 à Juba au Soudan (38) et cultivée pendant quelque temps à Khartoum, elle a été envoyée vers 1948 au Laboratoire de Vom en Nigéria, avec d'autres souches soudanaises. Là, elle a été soigneusement étudiée par GAMBLES (5) puis par LINDLEY (15) avant que de gagner l'Australie où les travaux de HUDSON ont confirmé son innocuité et sa valeur (6, 7) dans les conditions australiennes. Utilisée au Kenya, elle paraissait y être d'une innocuité totale et avait servi en Nigéria à « saturer » les foyers enzootiques où, couplée à la pratique de l'abattage, elle semblait être venue à bout de l'infection (35, 4).

On ne songeait pas alors à Farcha à préconiser l'utilisation du vaccin KH 3 J en Afrique centrale pour la double raison que les services vétérinaires étaient occupés par la campagne conjointe antipestique et que le vaccin T<sub>2</sub> d'ovoculture donnait apparemment satisfaction aux utilisateurs. Toutefois, comme elle avait été tant vantée à la réunion de Muguga et « pour rester dans le vent », la souche KH 3 J fut importée du laboratoire de Vom en mars 1964. On se contentait en 1964-65 de préciser quelques modalités de sa production en ovoculture, de vérifier son innocuité et la valeur de son pouvoir immunigène. Celui-ci paraissait être modeste : résistants après 3 mois, au 6<sup>e</sup> mois après la vaccination avec un vaccin KH 3 J d'ovoculture les bovins vaccinés contractaient la péripleurmonie lors de l'épreuve par contact (31). Un vaccin lyophilisé de culture en bouil-

lon, utilisé à titre purement expérimental dans des foyers de maladie, y déterminait une évolution traînante de la maladie sans flambée de mortalité post-vaccinale; tout se passait comme si l'on n'avait pas vacciné, si ce n'est qu'au bout de six semaines on ne détectait plus de cas cliniques.

Malgré les réserves des expérimentateurs, qui faute de contrôles adéquats pouvaient penser à l'existence d'animaux porteurs de lésions encapsulées, éleveurs et vétérinaires se déclaraient satisfaits parce que, là où l'on avait vacciné, la péripneumonie avait apparemment disparu. Il ne pouvait être question, on le conçoit, qu'avec ces doutes et cette expérimentation réduite nous recommandions la souche KH 3 J.

A cette époque, vers le milieu de 1965, un revirement se dessinait dans la politique sanitaire du Service de l'Elevage du Tchad (11) qui envisageait de plus en plus une action de masse contre la péripneumonie entreprise sous le couvert de celle en cours contre la peste bovine. Les accidents de vaccination associée relatés plus haut le décidaient à abandonner le vaccin T<sub>2</sub> d'ovoculture, jugeant que les soins requis par son inoculation dans le mufle n'étaient compatibles ni avec la répugnance affichée par les éleveurs à effectuer une contention sérieuse, ni avec la technicité réduite des vaccinateurs, facteurs influant d'ailleurs l'un sur l'autre. La question était alors inopinément posée au laboratoire de produire un vaccin antipéripneumonique, inoculable sous la peau, si possible associé au vaccin antipestique dans la même injection. Fort des quelques résultats apparemment heureux de son emploi dans des foyers de péripneumonie et malgré les scrupules des auteurs de ces lignes, il était fortement suggéré d'utiliser la souche KH 3 J.

Leurs réticences étaient partiellement levées à l'affirmation que ce qui importait le plus n'était pas d'avoir une protection à 100 p. 100 mais de hausser le niveau moyen d'immunité du bétail tchadien en attendant le jour où une autre action serait envisageable. Pour les dépenses extrêmement modiques résultant de l'utilisation d'un vaccin mixte, l'objectif paraissait être valable.

Etant donné l'urgence, il ne pouvait être question d'entreprendre l'étude approfondie d'une autre souche vaccinale. Ainsi l'on s'orienta vers un vaccin mixte où serait incor-

porée la souche KH 3 J qui offrait au moins d'emblée l'avantage d'une innocuité totale par inoculation sous-cutanée, ce qui restait à démontrer pour d'autres souches, à défaut d'une immunité de valeur connue pour le bétail tchadien.

### 3. Problèmes techniques à résoudre

Le principal, celui de l'association vaccinale, n'offrait pas de difficultés avec le virus bovine pestique de cultures cellulaires. L'objection qu'avaient opposée MACADAM et collab. (17) de l'inactivation possible du virus par le sérum présent dans le milieu de culture du mycoplasme n'en était pas une pour nous qui avons toujours utilisé du sérum de cheval. Il restait d'autres problèmes :

— devoir incorporer une culture vivante de *Mycoplasma mycoides*, culture qui pour être immunigène doit rester viable, à des liquides de cultures cellulaires contenant nécessairement du fait de nos conditions de travail un mélange polyanthibiotique (pénicilline, streptomycine, néomycine, kanamycine, fungizone) dont 3 au moins sont des mycoplasmodocides connus;

— étant donné les dilutions successives et les pertes en unités viables que subirait la culture de *M. mycoides* lors de sa préparation puis de son emploi (culture proprement dite, dilution avec le vaccin antipestique, lyophilisation, reconstitution et nouvelle dilution lors de l'emploi), il fallait obtenir des cultures primaires très riches de la souche KH 3 J.

Les réponses à ces deux problèmes furent apportées de la façon suivante :

a) Sélection d'un mutant streptomycino-résistant de la souche KH 3 J

On pouvait, sans grands risques, n'incorporer aux liquides de culture cellulaire du virus pestique après la phase de croissance des cellules et lors de celle de replication du virus, que deux antibiotiques : pénicilline et streptomycine. Seul ce dernier possède une activité sur *M. mycoides*, et encore est-ce une question de souches, et de plus il existe des mutants insensibles. Un mutant fut très aisément obtenu de la façon suivante :

— dans une série de tubes de bouillon au sérum de cheval, on ajoute de la streptomycine aux concentrations de 1 à 10 µg/ml; puis on ensemence la souche KH 3 J (89<sup>e</sup> passage). Un

tube à c : 10 µg présente une culture que l'on repique dans des tubes contenant 20, 30, 40, 50 µg de streptomycine/ml.

Une culture débute dans un tube à 40 µg. On repique alors en nappe sur gélose au sérum sur laquelle sont déposés des disques (\*) imprégnés de streptomycine. Quelques colonies apparaissent en bordure du disque. Elles sont repiquées sur gélose-sérum pour s'assurer de leur pureté, puis l'espèce identifiée par inhibition de croissance sur gélose avec des disques imprégnés d'antisérum *M. mycoides* (34). Une « banque » du mutant, le 94<sup>e</sup> passage de la souche, est alors constituée. Le mutant fut désigné par le sigle KH 3 J-SR.

#### b) Enrichissement des cultures

La seconde difficulté résidait dans le fait que le vaccin antipestique étant, pour des raisons d'économie, présenté en flacons de 100 doses et tenant compte de ce qu'il ne paraissait pas opportun en ce qui concerne les vaccinateurs de changer le conditionnement, il était nécessaire de disposer d'une suspension vaccinale de mycoplasmes très riche à incorporer au vaccin antipestique pour obtenir un nombre suffisant de micro-organismes par dose vaccinale ( $10^8$  environ).

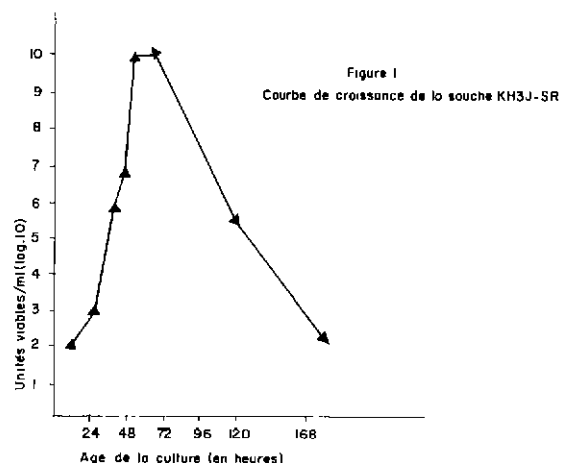
Une première solution consistait dans la concentration des cultures par centrifugation, solution retenue à l'EAVRO pour la lyophilisation des vaccins péripneumoniques, qui a les désavantages de l'incommodité et de la fragilisation des mycoplasmes; elle n'a été utilisée qu'à titre expérimental.

Une seconde solution pouvait être la concentration par carboxyméthylcellulose comme cela est pratiqué pour le vaccin *Brucella abortus* B 19 (40). Divers essais entrepris avec toute une gamme de concentrations de CMC n'ont pas permis d'obtenir de sédimentation des cultures de KH 3 J.

La solution finalement retenue a été l'augmentation de la richesse des cultures qui seraient dès lors tout simplement mélangées au vaccin antipestique et à un diluant de lyophilisation. La recherche d'un milieu de croissance très favorable à la culture de *M. mycoides* était depuis plusieurs mois l'un de nos objectifs pour une autre raison (31); c'est ainsi que fut déve-

loppé le milieu F-66 dont on trouvera plus loin la composition et la méthodologie de la préparation. Quoique de préparation empirique, il présente les avantages de pouvoir être produit par un personnel non spécialisé et d'assurer néanmoins une croissance constante des mycoplasmes.

Il importait de connaître cette croissance et son devenir. Les titrages de cultures à 37° C mises sous agitation magnétique 24 heures après l'ensemencement permettent de dresser une courbe de croissance dont les caractéristiques sont intéressantes à connaître (fig. 1,



Le nombre d'unités viables est maximal de la 65<sup>e</sup> à la 70<sup>e</sup> heure; cela correspond à l'augmentation de l'opacité; mais alors que celle-ci continue de croître pendant quelque temps, le titre décroît rapidement après la 80<sup>e</sup> heure. C'est là un point particulièrement important puisqu'il est dès lors impérieux de ne pas récolter les cultures plus de 3 jours après l'ensemencement. En perdant de vue cette notion, on s'expose à ne manipuler que des produits sans valeur, ce qui a pu faire décrier dans un passé encore récent la valeur des vaccins antipéripneumoniques en phase liquide, dont ceux de la souche KH 3 J, où la vitalité des cultures, condition *sine qua non* de leur pouvoir immunigène, baisse rapidement. La richesse des cultures ainsi obtenues est excellente, avoisinant  $10^{11}$  unités viables par ml, avec une fois un pic à  $10^{12}$ ; cette richesse permet après dilution et lyophilisation du vaccin d'obtenir  $10^9$  unités viables par dose vaccinale.

#### c) Problèmes de lyophilisation

Le vaccin antipestique de culture cellulaire est à l'ordinaire lyophilisé dans une solution de

(\*) SERPASTEUR, 36 rue du Docteur Roux, Paris (15<sup>e</sup>).



peptone à 5,5 p. 100. Il convenait d'essayer ce diluant concurremment à d'autres. Ont ainsi été testés : le tampon de FRY et GREAVES utilisé pour la lyophilisation de notre souche T<sub>2</sub> d'ovoculture; le diluant employé à Weybridge pour lyophiliser le vaccin B 19 (\*); la peptone à 5,5 p. 100; celle à 11 p. 100.

Il était recherché à la fois la meilleure survie après lyophilisation et la meilleure tenue en température lors du stockage. Finalement, furent retenus la peptone à 11 p. 100 et le tampon de Weybridge, ce dernier étant de manipulation plus délicate car pouvant « bouillir » lors de la mise sous vide du caisson de lyophilisation.

Les problèmes de pure technique paraissant être résolus, on pouvait passer à la production. Le dernier point préliminaire restait à choisir un nom de code pour ce vaccin; celui de « BISEC » fut retenu, qui caractérisait à la fois la dualité de la vaccination et l'état lyophile du vaccin.

### III. METHODOLOGIE DE LA PRODUCTION DU VACCIN « BISEC »

*« Those are little things that count »  
(proverbe américain)*

Il n'y a pas de difficultés spéciales de production mais la pratique exige une excellente synchronisation des deux opérations principales (culture du virus pestique, culture du vaccin péripneumonique) pour que les récoltes aient lieu au moment du rendement optimal. Il y a là un tour de main que seule la pratique apprend : il faudra en effet surveiller attentivement les cultures cellulaires infectées de virus pestique pour n'ensemencer les ballons de milieu F-66 destinés à la production péripneumonique que 65 à 70 heures avant la récolte prévue du virus. Cela implique de tenir toujours prêts des inoculums en phase liquide de la souche KH 3 J-SR pour maintenir autant qu'on le peut la croissance du mycoplasme en phase logarithmique.

Le calendrier de production suivant résume les opérations dont les détails seront ensuite décrits (tableau 1).

(\*) Bacto-casitone 5; saccharose 10; glutamate de sodium 2; en p. 100 p/V eau distillée pH 7.

## A. Production de l'antigène bovipestique

### 1. Cultures cellulaires

Ce sont des cellules de rein d'embryon de veau trypsinées et mises en culture selon les procédés classiques. Les embryons de veau sont récoltés à l'abattoir de Fort-Lamy, mais le fait que le Tchad soit encore maintenant infecté de peste bovine, de maladie des muqueuses et de fièvre aphteuse (virus SAT<sub>1</sub>) nous oblige à prendre certaines précautions.

Les cellules de rein d'embryon de veau sont d'abord cultivées en première explantation en boîte de Roux de un litre avec 100 ml de milieu à 0,5 p. 100 d'hydrolysate de lactalbumine.

Ce milieu est voisin de celui recommandé par MELNICK et RIORDAN (19). Il a l'avantage d'être économique et facile à préparer. Le sérum de cheval préconisé est remplacé par du sérum de veau importé de France régulièrement par voie aérienne. On y ajoute les vitamines (acide folique, biotine et complexe B) indiquées dans la préparation du milieu de LEPINE (12). Quatre antibiotiques et un antifongique sont inclus dans le milieu : pénicilline 100 U.I./ml, streptomycine 25 µg/ml, néomycine 50 µg/ml, kanamycine 50 µg/ml et fungizone 2,5 µg/ml. L'antifongique est absolument indispensable car bien que les manipulations soient faites dans deux petites pièces stérilisées maintenues en surpression par de l'air filtré pulsé, en fin de saison des pluies et au moment de la floraison des foins peuvent se produire de très nombreuses contaminations par les champignons.

Après 4 jours d'étuve à 37° C, on obtient une couche cellulaire continue. Par décollage de cette couche cellulaire au versène, on réalise des cultures secondaires : après un vigoureux pipetage destiné à réaliser la meilleure homogénéisation possible de la suspension cellulaire dans un volume de milieu égal à celui des boîtes d'origine, celle-ci est répartie à raison de 100 ml dans des flacons à plasma en verre blanc ordinaire.

Ainsi, les cellules d'une boîte de Roux auront été transférées dans un flacon à plasma où elles donneront une nappe cellulaire de surface double pour un même volume de milieu.

Deux boîtes de Roux sont, après changement de milieu, conservées intactes jusqu'à la fin des manipulations du lot de vaccin. Pendant ce

TABLEAU I

Calendrier de production d'un lot de vaccin Bisec

Jour	Composant pestique (RPOK - BK 36)	Vaccin mixte (Bisec)	Composant péripneumonique (KH <sub>3</sub> J-SR)
J 2 ou 3	Peptone	Flaconnage (lavage - impression) stérilisation, entreposage au froid	Bouillon coeur Extrait de levure
J	Cultures primaires de rein d'embryon de veau		Préparation du milieu Epreuve de stérilité
J + 4	Changement de milieu		
J + 6 ou 7	Culture secondaire Changement de milieu de deux témoins primaires		Ensemencement de tubes à partir de la banque
J + 9			Ensemencement fiole Fourneau
J + 10	Infection		
J + 12			Ensemencement ballons
J + 13	Début des lésions		Mise sous agitation magné- tique
J + 15	Récolte Infection des témoins avec virus MD-III		Récolte
J + 17		Mélange Répartition Lyophilisation lente Bouchage sous vide	
J + 17 J + 21 <i>ad libitum</i>		Contrôle d'homogénéité Lecture infection de J + 15 Contrôle pureté bactério- logique, identité KH <sub>3</sub> J-SR, innocuité, identité virologique titres.	

temps, elles seront examinées fréquemment puis incluses dans les contrôles du lot.

Les flacons à plasma sont placés horizontalement dans des alvéoles percées sur 2 grandes roues tournant à la vitesse de 7 tours à l'heure et placées dans une chambre-étuve à 37° C.

Ces deux roues, d'un diamètre de 95 cm, sont entraînées par un moteur électrique et peuvent porter chacune trente six flacons. Cet appareil est inspiré de celui de LEUNEN (14).

Un tel système de culture de cellules de deuxième explantation en flacons tournants a plusieurs avantages appréciables. D'une part, il permettrait éventuellement de faire « sortir »

certains virus latents, passés inaperçus sur les cellules de première explantation, d'autre part la qualité de la couche cellulaire est plus uniforme, enfin la quantité de cellules infectées est multipliée par 2,5 pour un même volume de milieu et partant la quantité de virus récolté plus importante.

Un tapis cellulaire complet et homogène se forme en 3 à 4 jours. Les cellules adoptent l'allure fibroblastique, formant de longues et larges « mèches » sans débris ni agrégats.

## 2. Banque de virus bovipestique

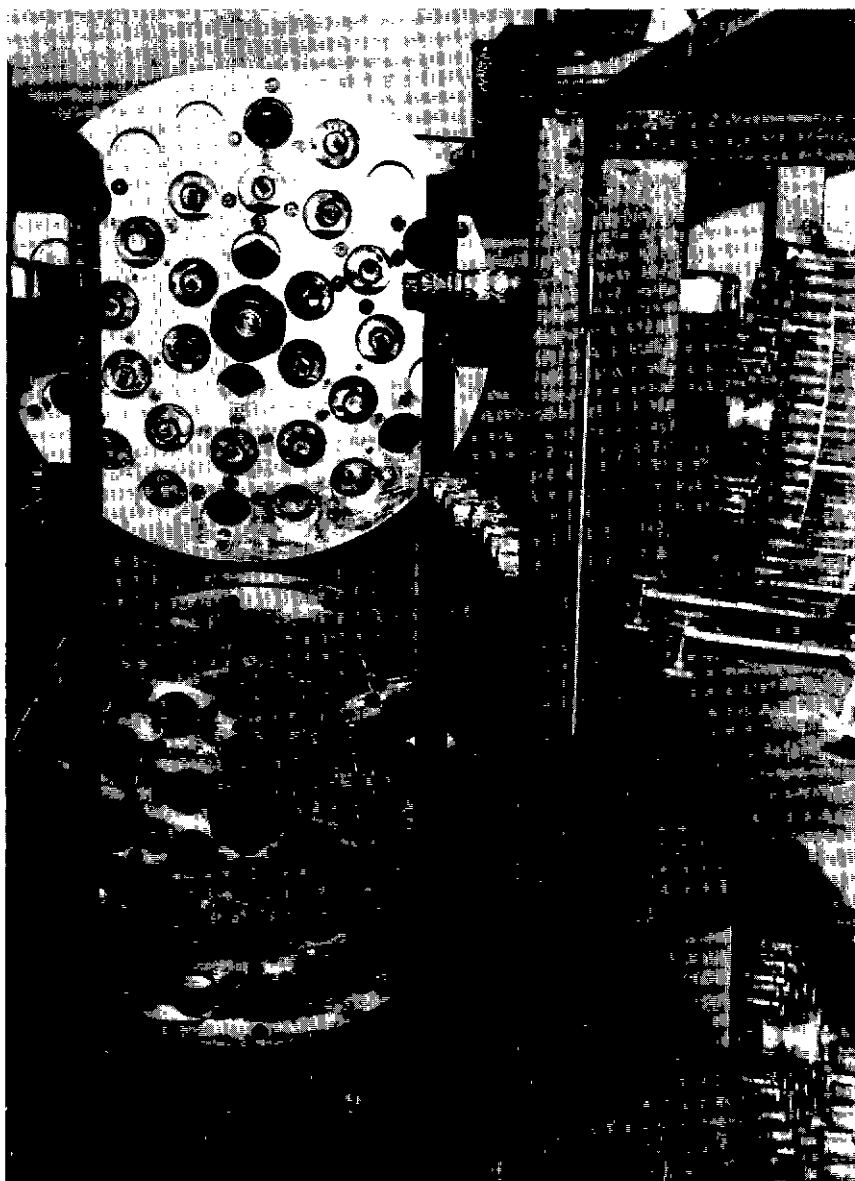
A partir du 32<sup>e</sup> passage de la souche RPOK - BK reçue de l'EAVRO, Muguga,

Kenya, on a réalisé une banque de virus. Liquides et cellules sont récoltés dans les conditions qui seront exposées ci-après, dilués au 1/10 en peptone à 5,5 p. 100, répartis en flacons et lyophilisés.

Cette récolte, le 33<sup>e</sup> passage, est la banque primaire qui sert à produire une banque secondaire pour le travail d'une année. A partir de là sont réalisées des banques tertiaires au 35<sup>e</sup> passage qui sont simplement congelées à

— 20° C sans être lyophilisées et servent aux productions et aux recherches.

Le virus est identifié par séro-neutralisation classique à sérum constant-virus variable en utilisant un sérum de lapin antipestique précipitant (36), en même temps qu'est réalisé un titrage sur cellules en tubes roulants. Les banques tertiaires doivent avoir le titre minimum de  $10^5$  DCP<sub>50</sub>/ml; en pratique elles le dépasse. On s'assure ainsi de la régularité des effets cytopathiques dans la suite des opérations.





### 3. Production du virus

#### a) Ensemencement

Le liquide de culture des flacons à plasma est vidé et on introduit 2 ml de liquide infectieux de la banque tertiaire (rapport d'infection : 0,01 environ). Les flacons sont reportés pendant 2 heures sur les roues tournantes pour réaliser l'infection cellulaire. On ajoute alors 100 ml de milieu de culture puis on remet sur le rouleau.

Un lot de vaccin est ordinairement constitué de 14 à 18 flacons infectés; deux flacons non infectés servent de témoins.

#### b) Récolte

Avec cette manière de procéder, les premières lésions du tapis cellulaire débutent le 3<sup>e</sup> ou 4<sup>e</sup> jour. C'est la toute première atteinte cellulaire avant même la lyse de cellules, qu'il importe de détecter car c'est à ce moment que l'on doit ensemer les milieux de production de la souche KH 3 J.

Le 5<sup>e</sup> ou 6<sup>e</sup> jour après l'infection, le tapis est ordinairement détruit à plus de 70 p. 100, montrant de nombreuses cellules étoilées avec de fins prolongements et quelques plasmodies multinucléés. Habituellement, tous les flacons sont au même stade de destruction cellulaire, ce qui permet de les traiter tous en même temps sans avoir à réfrigérer les plus avancés en attendant la lyse des autres.

On doit voir là un net avantage pour le titre des récoltes car lors des congélations se produisent des pertes en virus. Il arrive néanmoins que l'on récolte en même temps que les flacons où le tapis cellulaire est le plus lysé d'autres où il l'est beaucoup moins, tenant compte de ce que le titre du virus dans la phase liquide ne suit pas la progression des lésions cytopathiques.

Les flacons sont vidés et les liquides de culture sont recueillis dans un ballon de 2 litres préalablement refroidi et remis aussitôt dans un congélateur en attendant la suite des opérations. Les cellules restant dans les flacons sont décollées de la paroi des flacons, soit par agitation de billes de verre, soit à l'aide d'un racloir de caoutchouc monté sur une tige de verre (ruber policeman). Les deux techniques se valent. Si l'on a pris soin de laisser 15 à 20 ml de liquide dans chaque flacon, les cellules décollées se trouvent alors en suspension dans un peu de

milieu. Cette suspension cellulaire est recueillie dans un bol de mixer stérile, après filtration à travers une épaisseur de gaze à larges mailles pour retenir les billes de verres dans le cas où le décollement des cellules a été réalisé par leur intermédiaire. La suspension cellulaire est homogénéisée dans le bol pendant 2 à 3 minutes (\*) puis récoltée dans un ballon de 1 litre tenu dans la glace fondante. Le contenu de ce ballon est ensuite ajouté à celui du ballon de 2 litres toujours sous froid. Ce point de technique est particulier au laboratoire de Farcha. C'est intentionnellement que n'est réalisée aucune centrifugation des récoltes.

#### c) Dilution

On a, au préalable, préparé une solution de peptone (néo-peptone Difco) à 11 p. 100 en eau distillée, stérilisée pendant 20 minutes à 110° C. Le pH est de 7,2. Suffisamment de temps avant l'emploi, elle est refroidie à 4° C. Les récoltes sont diluées au 1/10 sous agitation magnétique en utilisant une verrerie refroidie au congélateur. On ne rajoute aucun antibiotique.

La suspension de virus pestique est alors prête à recevoir la culture péripneumonique dans les minutes suivantes.

## B. Production de l'antigène péripneumonique

### 1. Préparation du milieu F-66

#### a) Macération du cœur de bœuf

Faire macérer à la température de 50° C 5 kg de hachis de cœur de bœuf dégraissé dans 10 litres d'eau distillée. Au bout d'une heure, porter à ébullition. Filtrer à chaud sur papier filtre (Laurent). Ajouter :

100 g de Bacto-Tryptose  
20 g de glucose  
25 g de phosphate disodique anhydre.

Chauffer vers 80° C pour dissoudre; filtrer à chaud sur papier filtre. On peut conserver quelques jours à 4° C.

#### b) Extrait de levure selon HERDERSCHEE

Triturer au mortier par petites quantités 1 kg de levure fraîche de boulanger avec 1 litre d'eau

---

(\*) Nous sommes parfaitement conscients du mauvais rendement de ce broyage. Il serait préférable de lui substituer un traitement rapide par ultra-sons qu'il nous est malheureusement impossible d'effectuer.

distillée. Porter à 80° C et ajuster, à cette température, le pH à 4,5 à l'aide d'acide chlorhydrique 12 N. Garder à 80° pendant 20 minutes en agitant.

Clarifier par filtration à chaud sur 2 épaisseurs de papier filtre ou mieux centrifuger et recueillir le surnageant.

Si l'on ne dispose pas de levure fraîche, on peut utiliser de la levure sèche. On ne triture alors que 250 g de levure avec 1 litre d'eau distillée.

L'extrait de levure clarifié ou centrifugé est utilisé le plus frais possible; on peut néanmoins le garder quelques jours à 4° C, temps au bout duquel il se forme un petit sédiment.

### c) Milieu final

A la macération de cœur de bœuf (dont le volume après filtration avoisine 9 litres) ajouter :

glycérol	3 g
acide oléique	0,150 g
acide palmitique	0,100 g
extrait de levure	500 ml
sérum de cheval	1.000 ml
pénicilline	10.000.000 U
colimycine (éventuel)	10 g

Les acides oléiques et palmitiques sont dissous avec 5 ml de soude 0,01 M dans un broyeur de verre; il se forme un gel qui est versé dans le milieu et dispersé sous agitation magnétique.

L'addition de colimycine ne se pratique que lorsque le milieu est destiné à l'isolement de mycoplasmes.

### d) Stérilisation

On pratique une filtration clarifiante sur disque Seitz A.W. puis stérilisante sur Seitz EKS 2. La répartition se fait en ballons de 10 litres à raison de 5 litres par ballon.

A la demande, on répartit aussi en tubes de 18 à raison de 9 ml de milieu et en fioles de Fourneau de 1 litre à raison de 500 ml. Il y a intérêt à éprouver la stérilité par 48 heures de séjour à l'étuve et utiliser aussitôt après sans stockage.

## 2. Inoculum

a) A partir d'un flacon de la banque KH 3 J-SR produite dans les conditions com-

mentées plus haut, on ensemence une douzaine de tubes de milieu F-66 contenant 1 mg de streptomycine par ml. Au bout de 48 heures, quand apparaît une opalescence et après avoir contrôlé la pureté au microscope à contraste de phase, on repique le dernier et l'avant dernier tubes où sont apparues des cultures dans 500 ml de milieu F-66 contenu dans une fiole de Fourneau de 1 litre; un barreau magnétique est introduit. On porte à l'étuve à 37° C; au bout de 24 heures on met en route l'agitateur magnétique. La culture servira d'inoculum 48 heures plus tard, soit 72 heures après l'ensemencement.

### b) culture

Cinq litres de milieu F-66 contenus dans un ballon de 10 litres et placés depuis 24 heures à la température de 37° C sont ensemencés avec 500 ml de l'inoculum de 70 heures.

On reporte à l'étuve à 37° en culture statique puis on met sous agitation « vortex » 24 heures plus tard. La récolte a lieu 65 à 70 heures après l'ensemencement bien avant que l'opacité soit maximale.

## C. Production du vaccin mixte

### 1. Mélange

Dès la fin de la dilution au 1/10 de la culture du virus pestique, on ajoute la culture de la souche KH 3 J-SR. Le mélange se fait à parties égales. Toutes les opérations (mesures de volume, dilutions) sont effectuées dans une verrerie refroidie depuis 24 heures au congélateur.

Le mélange est agité manuellement. Sa température, variable avec la saison, est de 20-25° C. Il y aurait intérêt à ce qu'elle soit plus basse en ajoutant une culture du microbe péri-pneumonique refroidie. Il y a pourtant là une inconnue car nous n'avons pas étudié le comportement de la souche KH 3 J-SR pendant la réfrigération. Avec la solution adoptée, le rendement paraît être bon et l'inactivation thermique du virus pestique réduite aux moindres frais.

### 2. Conditionnement

Des flacons de type pénicilline de 20 cc ont reçu une impression à l'encre portant le nom du

vaccin, le nom du laboratoire et le nombre de doses, puis ont été passés au four Pasteur, ce qui à la fois les stérilise et cuit la peinture. Ils sont refroidis en chambre froide pour être amenés à  $+4^{\circ}$ .

Placé dans un bain de glace fondante, le vaccin dilué est réparti à raison de 5,5 ml par flacon. Par lots de 120, les flacons sont portés immédiatement sur les étagères à  $-50^{\circ}\text{C}$  d'un lyophilisateur Stockes.

### 3. Cryosublimation

Après congélation, les plateaux contenant les flacons sont reportés sur les étagères à  $-30^{\circ}\text{C}$  de l'appareil, le caisson est fermé et la mise sous vide effectuée.

La tendance a longtemps été de conduire des lyophilisations rapides en apportant dès la demi-heure suivant la mise sous vide des calories supplémentaires au produit en voie de cryosublimation.

L'expérience nous a montré qu'il était préférable de réaliser des lyophilisations lentes s'étendant sur 44 heures : on ne commence à apporter des calories au produit pour le ramener à température ambiante que lorsqu'il est déjà desséchée à  $-20$ — $-30^{\circ}\text{C}$ , ce qui demande 24 heures environ.

En ce qui concerne le virus pestique, le titre des vaccins lyophilisés lentement est supérieur d'au moins un logarithme au titre des vaccins lyophilisés plus vite. C'est ainsi que les lots n° 19 et 20, lyophilisés lentement, avaient des titres respectifs de  $10^{6.5}$  et  $10^{5.9}$  DCP<sub>50</sub>/ml de vaccin reconstitué à son volume primitif, alors que les lots 17 et 18 lyophilisés en 18 heures, avaient des titres acceptables mais inférieurs :  $10^{4.9}$  et  $10^{5.2}$ .

La lyophilisation terminée, les flacons sont sortis du caisson de l'appareil et fermés sous vide avec un bouchon de caoutchouc à canelures. Le vide est individuellement vérifié dans chaque flacon avec un éclateur à haute fréquence (\*). Une étiquette portant imprimé le numéro du lot de vaccin est collée sur le bouchon de caoutchouc.

Une capsule d'aluminium de teinte or maintient en place après sertissage, bouchon et étiquette. La couleur de la capsule est un code destiné à identifier le vaccin au cas où s'effaceraient les inscriptions imprimées en cours de stockage ou du transport sous glace en caisson isotherme; à l'usage cette pratique se révèle très utile. A la suite des opérations, les flacons de vaccin sont stockés par lot de production à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## D. Contrôles de production

### 1. Contrôle extérieur

L'homogénéité de la production est contrôlée par examen de flacons pris ça et là dans tous les plateaux. On observe la porosité apparente du produit, sa couleur, sa matité, la vitesse de réhydratation par addition d'eau. La présence de pellicules translucides difficiles à remettre en suspension rend suspecte la qualité de la lyophilisation.

Quinze flacons sont prélevés pour contrôles ultérieurs et conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ ; parmi eux, 4 au moins seront conservés pendant 5 ans.

### 2. Contrôle de pureté bactériologique

Il est effectué par ensemencement de 0,1 ml de la pastille vaccinale, réhydratée à son volume primitif, en bouillon aérobie et anaérobie, avec ou sans sérum. Après 7 jours à  $37^{\circ}$ , seuls les tubes de milieu aérobie avec sérum devront présenter un louche, celui d'une culture des mycoplasmes du vaccin.

Un premier contrôle d'identité du mycoplasme du vaccin est effectué par ensemencement en nappe sur milieu F-66 gélosé de 0,2 ml de vaccin réhydraté. On laisse sécher 2 heures à l'étuve puis on applique sur la gélose :

- des disques imprégnés d'antisérum d'âne ou de lapin anti- *M. mycoides*; après 4 à 5 jours d'étuve à  $37^{\circ}\text{C}$ , on voit clairement la zone d'inhibition dans la nappe des mycoplasmes.

- des disques imprégnés de streptomycine; il ne devra pas y avoir d'inhibition de la croissance à leur contact.

### 3. Contrôle d'innocuité

On l'effectue sur 4 cobayes et 6 souris. Deux reçoivent par voie sous-cutanée 1 ml de vaccin

(\*) H. F. Tester, model T 2 — Edward High Vacuum Ltd., Manor Royal, Crawley, Sussex, Angleterre.

reconstitué à son volume primitif avec de l'eau distillée. Les animaux sont mis en observation pendant un mois, temps au bout duquel ils sont tuberculinisés puis sacrifiés. Deux autres cobayes reçoivent 0,1 ml du vaccin reconstitué par voie intradermoplastaire et sont mis en observation pendant une semaine. Ils ne doivent présenter aucune lésion podale (recherche du virus aphteux). Six souris sont inoculées par voie intracérébrale avec 0,03 ml de vaccin. Elles doivent être en vie 3 semaines plus tard, en négligeant les mortalités accidentelles des premières vingt-quatre heures.

#### 4. Contrôle de la pureté virologique

On réhydrate à leur volume primitif le contenu de 2 flacons, on les mélange et on centrifuge pour sédimenter d'éventuels débris cellulaires. On réalise ensuite une séro-neutralisation avec un sérum de lapin antibovipestique précipitant (36), par mélange d'un ml de ce sérum avec un ml du surnageant de la centrifugation et après séjour du mélange pendant 1 heure à 37° C, on ensemence 10 tubes roulants de cellules secondaires de rein d'embryon de veau. Cinq tubes sont mis à cultiver avec le milieu ordinaire au sérum de veau de France, 5 autres reçoivent un milieu de type Eagle BEM contenant 10 p. 100 de sérum de poulain.

Ces deux milieux contiennent les antibiotiques déjà cités dont la présence entrave le développement du microbe péripneumonique du vaccin.

Dix tubes du même lot de cellules secondaires sont conservés comme témoins, la moitié recevant le milieu ordinaire, l'autre moitié le milieu au sérum de cheval. Aucun des tubes ne doit présenter de lésions, sauf de vieillissement, après 12 jours d'observation.

Depuis la reconnaissance de l'extension au Tchad et dans le Nord-Cameroun de la maladie des muqueuses, on introduit un autre contrôle sur les cellules productrices de virus qui pourraient être souillées par une souche non cytopathogène de ce virus. A cet effet, après rinçage pour éliminer le sérum de veau, on infecte avec 1.000 DCP<sub>50</sub> de la souche MD-M<sub>1</sub> (32) sous le volume d'un ml l'une des boîtes de Roux de la culture primaire des cellules ayant servi à la production du lot; les deux boîtes, l'une infectée et l'autre conservée comme témoin, reçoivent le milieu de Eagle BEM au sérum de poulain. On les conserve 6 à 7 jours,

temps au bout duquel la boîte infectée ne montre plus que des débris cellulaires, alors que la nappe cellulaire de la boîte témoin doit être intacte ou ne présenter que des signes de vieillissement (prédominance de fibroplastes) dus à l'entretien du sérum de cheval. Si aucune lésion cytopathogène n'apparaissait sur la boîte infectée avec la souche MD-M<sub>1</sub>, cela démontrerait que les cellules étaient déjà contaminées par une souche non cytopathogène du virus de la maladie des muqueuses.

Il nous est ainsi arrivé en deux occasions d'avoir une contamination par le virus de la maladie des muqueuses, l'une avec une souche non cytopathogène, l'autre cytopathogène.

#### 5. Contrôle du titre

Deux flacons de vaccin sont chacun réhydratés avec 100 ml d'eau distillée glacée (un flacon est donné pour 100 doses vaccinales), les dilutions mélangées. Un ml de la solution représente une dose vaccinale.

##### a) Contrôle du titre du composant pestique

Une partie du vaccin dilué est centrifugée pour sédimenter d'éventuels débris et le surnageant dilué en progression géométrique de raison 2 à partir d'une dilution primitive au 1/10.

On infecte 5 tubes de cellules avec 0,2 ml par tube de chacune des dilutions 1/80 à 1/2560 puis on remet en culture en milieu polyanthibiotique au sérum de veau. La lecture intervient 12 jours plus tard. Le titre est calculé selon la méthode de REED et MUENCH. On admet le titre minimum de 10<sup>2,5</sup> D.C.P.<sub>50</sub> par ml de vaccin reconstitué. Ce titre est pratiquement toujours dépassé.

##### b) Contrôle du titre du composant péripneumonique

A partir d'un ml de la suspension vaccinale reconstituée, on réalise des dilutions géométriques de raison 10 dans des tubes contenant 9 ml de milieu F-66 à 1 mg de streptomycine par ml. A partir de chaque tube de dilution sont ensemencés 5 tubes avec 1 ml de la dilution correspondante. On porte à l'étuve à 37° C. Le titre est apprécié par la méthode de FISHER et YATES en comptant les tubes où existe une culture visible et en la contrôlant éventuellement au microscope à contraste de phase.

Le titre requis est de  $10^8$  unités viables par ml (dose vaccinale); il est fréquemment dépassé.

Ce test est en même temps un contrôle supplémentaire d'identité de la souche streptomycino-résistante.

## 6. Contrôle d'efficacité

Il y a lieu ici d'être particulièrement réaliste. Il est loin de notre pensée de critiquer l'utilité, voire la nécessité d'un test. Mais il faut dire aussi que compte tenu des circonstances, il est économiquement et matériellement irréalisable pour l'ensemble des lots de production. Ceux-ci sont de 10 à 15 par an, ce qui représente, uniquement pour les contrôles, un besoin annuel d'une soixantaine de bovins à coup sûr sensibles à la peste et 125 sensibles à la péripneumonie.

De tels animaux sont devenus introuvables au Tchad. Certes, on pourrait théoriquement faire une présélection des bovins de contrôle par examen de leur sérum en ce qui concerne les anticorps antipestiques. Il serait peut-être possible de trouver de tels bouvillons dans les troupeaux.

Mais cela suppose la confiance et la collaboration des propriétaires en ce qui concerne la déclaration d'existence de tels animaux, la saignée, le gardiennage; cela pré-suppose aussi que des agents du laboratoire puissent librement circuler en toute sécurité ce qui n'est pas dans les conditions socio-politiques actuellement existantes. Le problème est le même pour trouver des bovins sensibles à la péripneumonie. Aussi, depuis plusieurs années, le laboratoire importe-t-il pour ses contrôles et expériences, des bouvillons achetés dans la région de Bouar en République Centrafricaine, état non infecté de peste et où aucune vaccination antipestique n'est pratiquée. On s'assure selon les lieux d'achat qu'ils proviennent d'une zone où l'on ne vaccine pas contre la péripneumonie, cette dernière vaccination étant restreinte à un périmètre réduit d'infection. Les bovins sont amenés en camion au laboratoire. Mais il faut encore tenir compte des possibilités routières, praticables uniquement pendant 5 mois de l'année. Ceci revient à dire qu'il nous faudrait constituer un stock d'environ 200 animaux sensibles en quarantaine sur la concession du laboratoire, seul lieu où le contrôle du mouvement des bovins et, partant, le contrôle sanitaire, soit effi-

cace au Tchad. On mesure pour qui connaît les lieux, la vanité d'une telle proposition.

C'est pour cet ensemble de raisons que ce contrôle n'est plus réalisé qu'une fois par an, en utilisant des bovins importés, alors qu'il y a quelques années il l'était sur chaque lot de production. La situation est encore plus pénible depuis quelques mois qu'existe une certaine tension politique entre les Etats d'Afrique centrale avec comme conséquence pratique, en ce qui nous concerne, une prudente expectative au regard de ces importations.

Ce problème des contrôles *in vivo*, particulièrement aigu au Tchad, va se poser aux autres laboratoires de production situés dans les zones où est passée la campagne interafricaine de vaccination antipestique.

### a) Contrôle d'innocuité et d'efficacité *in vivo* du composant pestique

Il utilise classiquement 6 bouvillons sensibles à la peste, importés dans les conditions précitées.

Un contrôle sérologique réalisé pendant leur quarantaine d'arrivée confirme l'absence d'anticorps antipestiques. Deux bouvillons reçoivent chacun, par voie sous-cutanée, le contenu réhydraté à son volume initial d'un flacon de vaccin; deux autres reçoivent 1/10 de dose vaccinale; deux enfin sont laissés en contact avec les précédents. Trois semaines plus tard, on fait une prise de sang pour juger des anticorps antipestiques puis on éprouve par inoculation sous-cutanée d'une suspension de rate bovipestique lyophilisée et régulièrement contrôlée en cultures cellulaires, en même temps qu'on donne un aérosol infectieux du virus.

Les vaccinés doivent résister et les deux témoins succomber ou être abattus à la dernière extrémité.

Malgré les restrictions apportées au contrôle *in vivo*, nous continuons à garder notre confiance dans notre production qui reste régulièrement contrôlée par des tests *in vitro*. Le contrôle sur bovins ne représente plus qu'une confirmation.

### b) Contrôle du composant péripneumonique

Comme pour le composant pestique, le contrôle n'est pas systématiquement réalisé.



Néanmoins seront relatés plus loin deux contrôles effectués « en vraie grandeur ».

#### **IV. APPLICATION SUR LE TERRAIN : CONTROLES DE L'IMMUNITE POST-VACCINALE**

Etudiée à la fin de l'année 1965, la production du vaccin mixte débutait en mars 1966. D'avril 1966 à avril 1969, 5.807.000 doses ont été produites, 5.558.400 satisfaisaient les tests de contrôle; deux lots sur 31 produits étaient rejetés.

Dans le même temps, 3.300.000 doses de vaccin antipestique simple de cultures cellulaires étaient produites.

Presque tout le vaccin mixte a été utilisé par le Service de l'Elevage du Tchad. Seuls quelques milliers de doses l'ont été en République Centrafricaine, sur du bétail de boucherie d'origine tchadienne, mais aussi sur des taurins baoulés placés au long des voies de commercialisation du bétail de boucherie.

Dans le contexte de cette réunion, le commentaire qui suivra aura exclusivement trait à la péripneumonie.

##### *1. Innocuité de la vaccination*

Sur plus de 4 millions de vaccinations pratiquées au Tchad, on n'a enregistré que 22 réactions locales d'environ la taille du poing sur 20 animaux, extensives comme d'authentiques réactions willemsiennes sur 2 autres. Il est difficile d'accuser le vaccin plus que l'équipe de vaccination à qui sont arrivés ces accidents et l'on ne peut s'empêcher de penser qu'il y a pu avoir confusion avec le vaccin péripneumonique d'ovoculture dans les congélateurs du secteur vétérinaire. Il semble qu'en toute conscience l'on puisse affirmer l'innocuité locale du vaccin.

Il paraît en être de même de son comportement dans les foyers. Il n'y a pas, comme avec le vaccin d'ovoculture, d'exacerbation de la mortalité après la vaccination. La maladie continue d'évoluer sur certains animaux puis cliniquement tout rentre dans l'ordre. Nous revenons sur ce fait.

##### *2. Efficacité de la vaccination*

On jugera d'après le rapport de Monsieur le Directeur du Service de l'Elevage du Tchad (11). Il est possible qu'en 1968 et au début de 1969 l'on soit au creux de l'un de ces cycles épizootologiques que l'on connaît pour la péripneumonie; pourtant la permanence de l'épizootie ces quinze dernières années au Tchad et l'aggravation de la situation dans le reste de l'Afrique font estimer que la vaccination du troupeau tchadien a joué un rôle bénéfique.

Il est bon de faire remarquer que la presque totalité du cheptel bovin a été vaccinée.

C'est à nos yeux le point important. Nous possédons en effet un autre exemple, dans un autre état, d'un foyer enzootique évoluant depuis une dizaine d'années où la vaccination avec la souche KH 3 J n'a été effectuée qu'à 60 p. 100 des troupeaux (18). Dans ces conditions la vaccination a paru être inefficace.

A l'opposé de cet exemple, P. LACHAUX (11) cite dans son rapport celui de la préfecture du Mayo-Kebbi où la totalité du troupeau a été vaccinée plusieurs années de suite. Il n'y a plus de péripneumonie clinique.

La vaccination avec le vaccin mixte — et cette opinion est valable pour la souche KH 3 J en général — semble être efficace en vaccination généralisée de couverture. Elle ne doit pas s'appliquer aux cas individuels, à la protection de tel ou tel animal. Elle ne prétend pas non plus, tout au moins dans les conditions actuelles, arriver à l'éradication de la péripneumonie, mais à la tenir sous contrôle.

A ces heureux résultats apparents, que répond le laboratoire ?

##### *3. Contrôles d'immunité post-vaccinale*

Il tombe sous le sens que devaient être entrepris par le laboratoire des contrôles d'immunité. Il y avait deux façons de les envisager :

— ou bien constituer un fond d'animaux non vaccinés, âgés de 18 à 20 mois, les vacciner, les entretenir et en soumettre périodiquement un nombre aliquote à un contrôle d'immunité; satisfaisante pour l'esprit, cette manière de faire revient très cher;

— ou bien acheter des bovins âgés d'environ 2 ans ne portant qu'une trace auriculaire de

vaccination du Service de l'Élevage et les soumettre au contrôle. Cette manière de procéder est certes dangereuse parce qu'en cas de résultat négatif, qui peut être dû à tout autre chose qu'à une faiblesse intrinsèque du pouvoir immunigène du vaccin péripneumonique, on conclura à l'inefficacité de la vaccination. En contre partie, elle permet de procéder à un contrôle effectif de cette vaccination telle qu'elle est effectuée par les équipes de vaccination; c'est ce qui compte en dernier ressort.

Partant sur ces bases, 2 contrôles ont été réalisés.

### *Matériel et techniques*

Le principe des contrôles d'immunité par l'épreuve du « contage virulent » est reconnu comme étant la méthode de choix (35.9); la méthode australienne a été adaptée aux conditions locales, spécialement en ce qui concerne la stabulation des animaux. Intubés, vaccinés et témoins, sont entretenus dans un parcours sablé d'environ 250 m<sup>2</sup> auquel sont attenantes 2 étables en permanence ouvertes pour que les animaux puissent s'abriter. Ils sont alimentés avec du foin et de la graine de coton. La durée de contact est portée de 2 à 3 mois par rapport à la méthode d'origine.

- Souche virulente. Bovins « donneurs ». La souche Afadé, régulièrement pathogène pour autant que l'on utilise comme matériel d'intubation un broyat de lésions péripneumoniques, sert à infecter des bovins neufs à sérologie péripneumonique négative; on utilise l'intubation endobronchique de 20 ml de broyat de poumon péripneumonique au 1/5 suivi d'un rinçage de 100 ml de milieu F-66.

- Bovins vaccinés. Bovins témoins. Treize bovins vaccinés sont achetés pour le premier contrôle sur le marché d'Ati à la mi-juin 1967. Ils ont été vaccinés en novembre 1966, soit depuis 7 bons mois. Ils sont introduits le 13 juillet avec 10 bovins intubés en même temps que 8 témoins non vaccinés, à sérologie péripneumonique et pestique négative. Trois autres témoins seront introduits 3 semaines plus tard.

Le contrôle se déroulant en saison des pluies, tous les animaux ont été maintenus sous prosalt d'Antrycide.

Pour la seconde épreuve, 26 bovins de 2 à 3 ans, ne portant qu'une marque de vaccination, sont achetés au début de novembre sur le marché de Dourbali; ils ont été vaccinés, d'après le Service de l'Élevage, au début de janvier 1967, donc depuis environ 11 mois au moment où ils entrent en expérience. Ils sont mis en contact avec 6 bovins intubés et 14 témoins le 5 décembre 1967.

- Tests sérologiques. La sérologie est suivie chaque semaine par les tests de fixation du complément, technique de Farcha (30) et le test des 4 tubes (34). Cette dernière épreuve se montre précieuse en détectant l'antigène circulant chez les malades.

- Examen clinique. Il est réalisé en principe tous les matins. On n'a guère qu'à noter la rhinite et une toux occasionnelle.

- Autopsies. Elles sont conduites soit lorsque meurt un animal, soit après abattage dans la dernière semaine de la période de 3 mois. On note l'aspect macroscopique du poumon, l'aspect de la plèvre, la consistance du poumon, l'éventuelle présence de séquestres par palpation, suivie de dissection et de culture des lésions éventuelles et systématiquement des ganglions drainant le poumon.

- Calcul du taux de protection. On a adapté le procédé de calcul australien de HUDSON et TURNER (9) aux conditions locales; au lieu de juger de la réponse clinique, on a apprécié la présence ou l'absence d'antigène circulant.

### • Résultats :

#### 1. Premier contrôle (13-7-1967 au 16-10-1967).

Dans son ensemble il a été profondément troublé par des mortalités dues à la heart-water : le spray ne fonctionnait pas et il n'est pas sûr que les animaux aient été correctement surveillés quant à leur alimentation. Sur 10 intubés, 6 sont morts de heart-water dans les 3 semaines suivant l'intubation; 2 avaient des lésions pulmonaires. Deux autres sont morts de péripneumonie aiguë 6 semaines après l'intubation; les 2 derniers possédaient lors de leur mort naturelle des séquestres et une sérologie négative.

Deux des animaux de ce groupe qui devaient mourir de heart-water quelques jours plus tard

ont présenté une négativation de la fixation directe du complément tandis que devenait positive la fixation indirecte dans le test des 4 tubes.

Parmi les 11 bovins témoins, il faut éliminer 3 animaux morts de heart-water dans les 3 semaines après la mise en contact. Les 8 restants sont tous devenus malades, soit cliniquement ou sur le vu de leurs lésions à l'autopsie, soit sérologiquement (fixation positive, présence d'antigène circulant); pour l'un d'eux la période d'incubation a été de 16 jours, peut-être moins, car l'antigène circulant était détecté dès la deuxième prise de sang.

Dans le groupe des 13 vaccinés, 5 sont morts de heart-water, donc plus tardivement que dans le groupe témoin: aucun n'avait de lésions pulmonaires à l'autopsie. Un animal a fait une péripneumonie clinique dont il est mort. Six sujets (dont 3 devaient mourir de heart-water dans les 15 jours suivants) ont présenté une fixation du complément positive (1/80 au test de Farcha) avec présence d'antigène circulant pour 2 d'entre eux. Ils sont ensuite, sauf les morts de heart-water, redescendus à un taux non diagnostique. Pendant cet épisode sérologique, quelques animaux toussaient. A l'autopsie des 7 bovins restant en fin d'expérience, on ne décelait aucune lésion active ni aucun séquestre; la plèvre pulmonaire présentait un dépoli (difficile à apprécier au demeurant car c'est une trouvaille d'autopsie fréquente) mais aucune adhérence pleurale. Les essais d'isolement de *M. mycoides* ont été infructueux.

Le tableau 2 tente de récapituler les résultats.

TABLEAU II

Résultats du premier contrôle d'immunité  
du vaccin Bisec

	Groupe témoin	Groupe vacciné
Nombre en expérience	8	7
Réactions sérologiques		
FC' +	6	7
FC' -	2	0
Ag circ.	6	2
Autopsies		
Péripneumonie	6	1
Séquestres	0	0
Dépoli pleural	2	6
Normal	0	0

On a éliminé de la comparaison des deux groupes les animaux morts de heart-water. Le calcul du taux de protection donne le chiffre de  $E_t = 67$  p. 100, chiffre qui est identique à celui de HUDSON (7) pour la même souche KH3J lors d'un contrôle 5-6 mois après la vaccination. Apparemment satisfaisant, ce chiffre appelle quelques commentaires.

La vaccination au vaccin Bisec effectuée depuis 7 mois protège de la péripneumonie évolutive 6 bovins sur 7. Il reste néanmoins que les 6 autres ont dû faire une maladie bénigne abortive dont ils guérissent sans séquelles ni lésions et sans devenir des porteurs chroniques. Il est dans ces conditions possible mais non démontré dans cette expérience, que de tels animaux puissent être vecteurs du contagion pendant quelque temps.

Si l'on compare les résultats de ce contrôle aux résultats publiés par les auteurs australiens (7, 9), on retrouve une similitude de comportement des animaux dans les 2 cas: infection abortive objectivée par une montée d'anticorps, lésions cicatricielles à l'autopsie ou séquestration.

Dans les 2 cas aussi existent des malades mourant de péripneumonie. Ce que l'on note dans ce contrôle n'est pas particulier au vaccin KH3J tchadien.

## 2. Deuxième contrôle (5-12-1967 au 5-3-1968).

Apparemment, les résultats paraissent être pour le clinicien aussi bons qu'au premier contrôle. Dans le groupe vacciné, on ne trouve de péripneumonie évolutive que chez un seul animal, présence d'antigène circulant chez 2, mais positivation de la sérologie (test de Farcha et test des 4 tubes) chez 11.

Le calcul du taux de protection indique par contre un effondrement à  $E_t = 23$  p. 100 par suite de la présence de bovins porteurs de lésions encapsulées. On jugera peut-être que cette appréciation est excessive car l'on n'a aucune preuve que ces animaux aient pu être contagieux. Il n'en reste pourtant pas moins qu'ils se sont infectés, et ceci d'une façon occulte.

## 3. Conclusion générale sur les contrôles de laboratoire.

La situation créée par la vaccination avec le vaccin mixte où est incorporée la souche KH3J-SR semble apparemment satisfaisante sur le terrain. A l'analyse et compte tenu des présents résultats, elle sera peut-être précaire si la couverture vaccinale n'est pas maintenue largement et pendant assez longtemps. Ne pas continuer de vacciner aboutirait à un échec car il est vraisemblable que sur l'ensemble de la population bovine doit exister un certain nombre de porteurs chroniques.

Le chercheur, quant à lui, n'est pas satisfait, car l'immunité engendrée dans les conditions de la pratique avec la souche KH3J-SR n'est pas stérilisante donc ne peut conduire à l'éradication en un temps court. Pour lui, cette vaccination maintient l'infection à l'état latent dans l'ensemble de la population et si l'heureux état de fait apparent, celui de la raréfaction des foyers, existe bien, cela n'est peut-être qu'un sommeil entretenu par la généralisation de la vaccination. Ce n'est que dans plusieurs années que l'on pourra conclure.

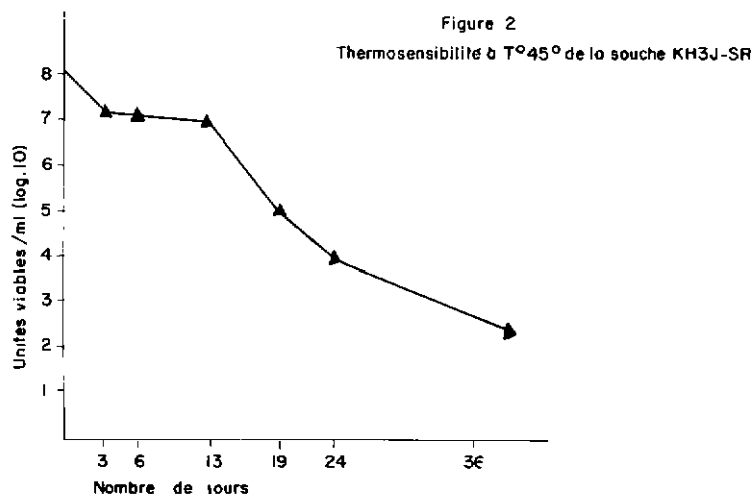
On mesure par ces lignes combien sont dissemblables les positions du praticien et de l'homme de laboratoire.

## V. CONCLUSIONS

Le vaccin mixte antipestique-antipéripneumonique dont la genèse et la production ont été commentées dans le présent rapport n'a pas, tel qu'il est, la prétention d'être la panacée ni la solution des problèmes de la prophylaxie des deux grandes épizooties africaines. Il est présenté simplement comme un vaccin qui a résolu en grande partie les problèmes de l'immunisation de masse tels qu'ils se posaient au Tchad.

Il possède, certes, de sérieux avantages, dont le principal est la facilité de son utilisation qui permet une diffusion très large au niveau des vaccinateurs de base.

Une autre qualité paraît être la bonne tenue en température de son composant péripneumo-



nique (figure 2), stable plus de 10 jours à la température de 45° C, rencontrée dans le sahel durant la saison sèche; cette thermostabilité relative contraste avec l'extrême fragilité à cette même température des vaccins liquides (8). Nous nous employons en ce moment à rendre également très thermostable à l'état lyophile le composant pestique du vaccin mixte, ce qui per-

mettra aux équipes de vaccination de se passer de l'obligation de devoir véhiculer le vaccin sous glace.

Sa faiblesse, aux yeux des contrôleurs, vient de son composant péripneumonique alors que tout autre est pourtant l'impression du praticien.

Aussi, ce qu'il nous paraît intéressant de retenir, c'est surtout l'idée de l'association des deux antigènes dans la même seringue avec les solutions adoptées pour y arriver.

C'est pour des raisons très particulières au Tchad qu'a été choisie la souche KH3J, souche qui paraissait être parfaite au moment de la conception du vaccin mixte voilà 4 ans. Elle recèle pourtant en elle des faiblesses intrinsèques malgré le très gros avantage qu'est son innocuité.

Rien n'interdirait de la remplacer dans le vaccin mixte par une autre souche.

Certains penseront à la souche T<sub>1</sub>, vantée sous d'autres cieux, et qu'assez récemment BROWN et TAYLOR (5) ont utilisée simultanément à la vaccination antipestique, avec le désavantage toutefois de devoir l'inoculer à l'extrémité caudale. Elle a pourtant donné des déboires à Farcha aux contrôles d'immunité par contagement 5 mois après la vaccination (2 malades sur 5 vaccinés). Notre opinion est que le vrai vaccin antipéripleumonique reste à trouver et qu'il est dangereux de vouloir extrapoler, sans contrôles sérieux, les heureux résultats obtenus dans les circonstances locales particulières d'une région à une autre région.

## SUMMARY

### **Immunological studies on bovine pleuropneumonia XI - A combined rinderpest-CBPP vaccine, inoculated in a single shot. Conception, production, controls**

After indicating the initial difficulties encountered in the association of rinderpest and CBPP vaccines, the authors expose the problems that they had to solve in order to produce a combined vaccine: choice of the vaccinal strains (RPOK-BK for rinderpest, KH 3 J for pleuropneumonia), cloning of a KH 3 J streptomycino-resistant mutant, enrichment of mycoplasma cultures, freeze-drying of the final product. Production technique of the combined vaccine, which has been codenamed : Bisec, is circumstantially described along with production controls. Mass vaccination on a large scale in Chad (5.500.000 vaccinations in 3 years) has resulted in a spectacular decrease of the number of CBPP outbreaks (from more than 200 to about 10); nevertheless, laboratory controls made by housing vaccinated cattle with infected ones, have shown that protection given the KH 3 J strain does not validly extend much beyond 6 months. The undeniable success of vaccination has to get from its generalisation and annual repetition to the chadian herd.

## RESUMEN

### **Investigaciones inmunológicas sobre la perineumonía. XI. Una vacuna mixta antipestosa y antiperineumonía inoculada en una sola vez. Concepción - Producción - Comprobación**

Después de haber indicado las primeras dificultades encontradas en la asociación de las vacunas contra la peste bovina y la perineumonía, los autores exponen los problemas que tuvieron que resolver para la producción de una vacuna combinada: elección de cepas vacunicas (RPOK-BK para la peste; KH 3 J para la perineumonía), selección de un «mutant» resistente a la estreptomicina de la cepa KH 3 J, enriquecimiento de los cultivos del micoplasma, liofilización del producto final.

Se describe con detalle el técnico de producción de la vacuna mixta, cuyo nombre de código es Bisec, así como las comprobaciones de producción. La aplicación, en gran escala, de la vacunación mixta en Chad (5.500.000 vacunaciones durante 3 años) permitió una disminución espectacular del número de los centros de perineumonía de más de 200 a una decena. Sin embargo, las comprobaciones del laboratorio, efectuadas por la cohabitación de los vacunados con los enfermos, indican que la protección dada por la cepa KH 3 J validamente excede apenas más de 6 meses. El éxito innegable de la vacunación debe de ser causado por su generalización al ganado de Chad y su repetición anual.



## BIBLIOGRAPHIE

1. BÖGEL (K.), PROVOST (A.) et ENDERS-RUCKLE (G.), « Hämaggglutination Hemmungreaktion mit Masern Antigen bei Rinderpest. II. Antikörperproduktion nach Inokulation verschiedener Lebendimpfstoffe beim Rind », *ZbL. Bakt.*, 1 (Orig), 1966, **201**, 137-153.
2. BROWN (R. D.), « Endobronchial inoculation of cattle with various strains of *Mycoplasma mycoides* and the action of stress », *Res. Vet. Sci.*, 1964, **5**, 394-404.
3. BROWN (R. D.) et TAYLOR (W. P.), « Simultaneous vaccination of cattle against rinderpest and contagious bovine pleuropneumonia », *Bull. epiz. Dis. Afr.*, 1966, **14**, 141-146.
4. « Contagious bovine pleuropneumonia », *Bull. epiz. Dis. Afr.*, 1964, **12**, 187-193.
5. GAMBLES (R. M.), « Studies on contagious bovine pleuropneumonia with special reference to the complement fixation test », *Brit. Vet. J.*, 1956, **112**, 34-40; 78-86; 120-127; 162-169.
6. HUDSON (J. R.), « Contagious bovine pleuropneumonia: Studies on the pathogenesis of lung lesions following vaccination with egg vaccine », *Aust. Vet. J.*, 1965, **41**, 36-42.
7. HUDSON (J. R.), « Contagious bovine pleuropneumonia: the immunizing value of the attenuated strain KH 3 J », *Aust. Vet. J.*, 1965, **41**, 43-49.
8. HUDSON (J. R.), « Contagious bovine pleuropneumonia: The keeping properties of the V5 vaccine used in Australia », *Aust. Vet. J.*, 1968, **44**, 123-129.
9. HUDSON (J. R.) et TURNER (A. W.), « Contagious bovine pleuropneumonia: a comparison of the efficacy of two types of vaccines », *Aust. Vet. J.*, 1963, **39**, 373-385.
10. JOHNSON (R. H.), « Rinderpest in tissue culture. III. Use of the attenuated strain as a vaccine for cattle », *Brit. Vet. J.*, 1962, **118**, 141-150.
11. LACHAUX (P.), « La prophylaxie de la péripneumonie contagieuse bovine au Tchad », *Bull. O.I.E.*, 1969, **72**, 61-70.
12. LEPINE (P.), DANIEL (PH.), PELMONT (P.) et SLIZEWICK (P.), « Cultures cellulaires dans un milieu utilisant l'hydrolysate de caséine comme source d'acides aminés », *Ann. Inst. Past.*, 1956, **90**, 654-656.
13. LÉPISSE (H.), « Campagne conjointe contre la peste bovine, CCTA-PC n° 15 », *Bull. épiz. Dis. Afr.*, 1963, **11**, 259-264.
14. LEUNEN (J.), STROBBE (R.) et MAMMERICKX (N.), « Notice technique sur un appareil à rouler des flacons pour cultures de cellules rénales », *Bull. O.I.E.*, 1962, **57**, 615-17.
15. LINDLEY (E. P.), « Experiments with an attenuated culture vaccine against contagious bovine pleuropneumonia », *Brit. Vet. J.*, 1965, **121**, 471-78.
16. LINDLEY (E. P.), « Simultaneous vaccination of cattle with contagious bovine pleuropneumonia and goat-adapted rinderpest vaccine », *Bull. epiz. Dis. Afr.*, 1967, **15**, 221-226.
17. MACADAM (I), EZEBUIRO (E. O.) et OREFO (V. D. G.), « The response of zebu cattle to mixed contagious bovine pleuropneumonia and tissue culture rinderpest vaccines », *Bull. epiz. Dis. Afr.*, 1964, **12**, 237-240.
18. MACON (J.), Communication personnelle.
19. MELNICK (J. L.) et RIORDAN (J. T.), « Polyomyelitis virus in tissue culture. IV. Protein-free nutrient media in stationary and roller tube cultures », *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1953, **81**, 208.
20. ORUE (J.), « Rapport annuel du Laboratoire de recherches vétérinaires de Dakar pour 1967 ».
21. PLOWRIGHT (W.), « The application of monolayer tissue culture techniques in rinderpest research. II. The use of attenuated culture virus as a vaccine for cattle », *Bull. O.I.E.*, 1962, **57**, 253-276.
22. PLOWRIGHT (W.) et FERRIS (R. D.), « Study with rinderpest virus in tissue culture. I. Growth and cytopathogenicity », *J. comp. Path.*, 1959, **69**, 152-172.
23. PLOWRIGHT (W.) et FERRIS (R. D.), « Studies with rinderpest virus in tissue culture. II. Pathogenicity for cattle of culture, passaged virus », *J. comp. Path.*, 1959, **69**, 173-184.
24. PLOWRIGHT (W.) et FERRIS (R. D.), « Studies with rinderpest virus in tissue culture. III. The stability of cultured virus and its use in virus neutralization tests », *Arch. ges. Virusf.*, 1961, **11**, 516-533.
25. PLOWRIGHT (W.) et FERRIS (R. D.), « Studies with rinderpest virus in tissue culture. The use of attenuated culture virus as a vaccine for cattle », *Res. Vet. Sci.*, 1962, **3**, 172-182.
26. PLOWRIGHT (W.) et TAYLOR (W. P.), « Long-term studies of immunity in East African cattle following inoculation with rinderpest culture vaccine », *Res. Vet. Sci.*, 1967, **8**, 118-128.
27. PRIESTLEY (F. W.), « Report to the government of the Sudan on Contagious Bovine Pleuropneumonia », *FAO Report n° 854*. Rome, Food and Agricultural Organization, 1958.
28. PROVOST (A.), In: « Rapport annuel du laboratoire de Farcha pour 1958 », p. 58.
29. PROVOST (A.), « Note sur la possibilité d'emploi du vaccin antibovipéristique de culture tissulaire pour la protection des zébus vivant en zone d'endémicité trypanosomienne », *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1961, **14**, 369-373.
30. PROVOST (A.), « Péripneumonie: bilan quinquennal d'activité ». Rapport annuel du laboratoire de Farcha pour 1966, **2**, 87.
31. PROVOST (A.), « Recherches entreprises sur la péripneumonie contagieuse des bovidés au laboratoire de recherches vétérinaires de Farcha, Fort-Lamy, Tchad, de 1964 à 1966 », *Bull., O.I.E.*, 1967, **67**, 199-246.
32. PROVOST (A.), BÖGEL (K.), BORREDON (C.) et MAURICE (Y.), « La maladie des muqueuses en Afrique centrale », *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1967, **20**, 27-49.
33. PROVOST (A.) et PERREAU (P.), « Le diagnostic expérimental de la péripneumonie bovine », *Bull. Assoc. Vet. Mic.*, 1968 (4).
34. PROVOST (A.) et QUEVAL (R.), « Recherches immunologiques sur la péripneumonie X. Proposition d'une nouvelle technique pour le diagnostic expérimental de la maladie: le test des 4 tubes », *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1968, **21**, 317-334.
35. « Rapport de la deuxième réunion du groupe d'experts mixtes FAO/OIE/CCTA sur la péripneumonie bovine. Rapport de réunion AN/1964/I ». Rome, F.A.O., 1964.
36. SCOTT (G. R.) et BROWN (R. D.), « Rinderpest diagnosis with special reference to the agar gel double diffusion test », *Bull. epiz. Dis. Afr.*, 1961, **9**, 83-125.

37. SIMPSON (R.), « A study of the immunity produced in cattle by simultaneous inoculation with a number of vaccines » *Bull. epiz. Dis. Afr.*, 1964, **12**, 405-428.
38. SMITH (G. R.), « Factors affecting bacteriemia in mice inoculated with *Mycoplasma mycoides* », *J comp. Path.*, 1968, **78**, 267.
39. THIERY (G ), « Hématologie, histopathologie et histochimie de la peste bovine », *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1956, **9**, 117-140.
40. VAN DRIMMELEN (G. C.), « Strain 19 Brucella vaccine. II. The preparation of freeze-dried live vaccine », *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 1956, **27**, 215-225.